(19) JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 07301636 A

(43) Date of publication of application: 14 . 11 . 95

(51) Int. Cl G01N 33/92
C12Q 1/26
C12Q 1/28
C12Q 1/44
C12Q 1/60
G01N 21/31
G01N 21/77

(21) Application number: 06089431

(22) Date of filing: 27 . 04 . 94

(30) Priority: 08 . 03 . 94 JP 06 37329

(71) Applicant: KYOWA MEDEX CO LTD

(72) Inventor: MIYAUCHI KAZUTO
KASHIWABARA NORIHIKO
TADANO TOSHIO
SHUDO EIKO
SUGIUCHI HIROYUKI
IRIE TETSUYOSHI
KAMIKAMA KANEHITO
OSAWA SUSUMU

(54) DETERMINATION METHOD FOR CHOLESTEROL IN HIGH DENSITY LIPOPROTEIN

(57) Abstract:

PURPOSE: To conduct the determination of cholesterol quantity in high density lipoprotein without performing complicated fractional separation by measuring the cholesterol quantity in low density lipoprotein, ultra-low density lipoprotein and chylomicron under the presence of a sugar compound and/or a protein solubilizer, and obtaining the difference from the total cholesterol quantity.

CONSTITUTION: A sugar compound is dissolved in an appropriate buffer solution and prepared to the concentration of 3-80mM. A protein solubilizer solution is made coexist with a cholesterol measuring reagent and prepared in such a way that the concentration is 0.1-20g/l at the time of reaction. A reagent is prepared from the protein solubilizer solution with the sugar compound solution and/or cholesterol measuring reagent coexisting therein and heat-insulated at 30-40°C for about five minutes, and then a sample is added thereto to react for 5-30 minutes. After the end of reaction, the absorbance of the reaction solution is measured, and the cholesterol quantity in low density lipoprotein, ultra-low density lipoprotein and chylomicron in the sample is measured to obtain the difference from the total cholesterol quantity. Cholesterol in high density lipoprotein can be thereby determined easily.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平7－301636

(43)公開日　平成７年(1995)11月14日

(51)Int.Cl.[6]		識別記号	庁内整理番号	ＦＩ	技術表示箇所
Ｇ０１Ｎ	33/92	Ａ			
Ｃ１２Ｑ	1/26		6807－4B		
	1/28		6807－4B		
	1/44		6807－4B		
	1/60		6807－4B		

審査請求　有　請求項の数７　ＯＬ　（全 9 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6－89431

(22)出願日　平成６年(1994)４月27日

(31)優先権主張番号　特願平6－37329

(32)優先日　平６(1994)３月８日

(33)優先権主張国　日本（ＪＰ）

(71)出願人　000162478
協和メデックス株式会社
東京都中央区入船二丁目１番１号

(72)発明者　宮内　一人
静岡県田方郡函南町仁田816－４

(72)発明者　栢原　典彦
神奈川県川崎市麻生区東百合ヶ丘４－46－７

(72)発明者　多々納　俊雄
静岡県沼津市大岡2297－６

(72)発明者　首藤　栄子
大分県大分市古国府東９組の５

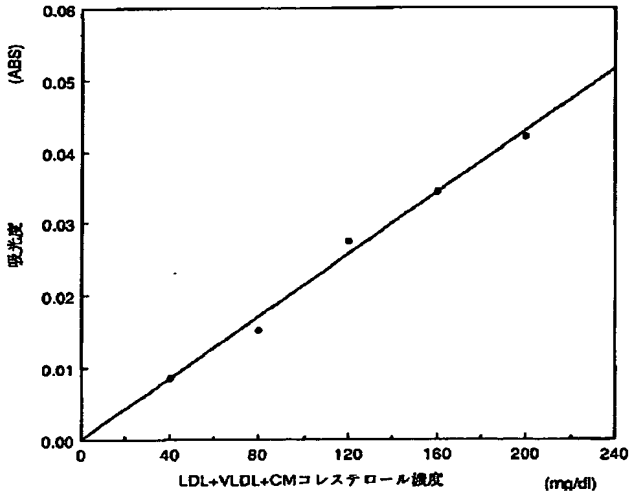
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　高密度リポ蛋白中のコレステロールの定量法

(57)【要約】

【目的】　煩雑な分画分離操作の不要な簡便な高密度リポ蛋白（ＨＤＬ）中のコレステロールの定量法を提供する。

【構成】　糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中の低密度リポ蛋白（ＬＤＬ）、超低密度リポ蛋白（ＶＬＤＬ）およびカイロミクロン（ＣＭ）中のコレステロール量を測定し、試料中の総コレステロール量との差を求めることを特徴とするＨＤＬ中のコレステロールの定量法、および糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中のＨＤＬ中のコレステロール量を測定することを特徴とするＨＤＬ中のコレステロールの定量法。



BEST AVAILABLE COPY

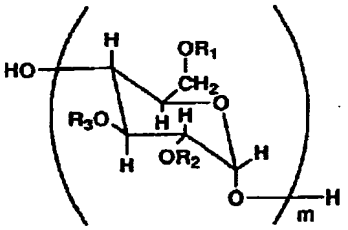
【特許請求の範囲】

【請求項１】　糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中の低密度リポ蛋白（ＬＤＬ）、超低密度リポ蛋白（ＶＬＤＬ）およびカイロミクロン（ＣＭ）中のコレステロール量を測定し、試料中の総コレステロール量との差を求めることを特徴とする高密度リポ蛋白（ＨＤＬ）中のコレステロールの定量法。

【請求項２】　糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中のＨＤＬ中のコレステロール量を測定することを特徴とするＨＤＬコレステロールの定量法。

【請求項３】　糖化合物が一般式（Ｉ）

【化１】



(I)

〔式中、R_1、R_2およびR_3は同一または異なって水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルカノイル、スルホ、－（グルコシル）$_p$－Ｈ（式中、ｐは１または２を表す）または－（マルトシル）$_q$－Ｈ（式中、ｑは１または２を表す）を表し、ｍは６～８の整数を表す〕で表される化合物または一般式（II）

【化２】

$$(C_6H_{10}O_5)_nSO_3R_4 \qquad (II)$$

（式中、R_4は水素またはＮａを表し、ｎは５～２０００の整数を表す）で表される化合物である請求項１または請求項２記載の定量法。

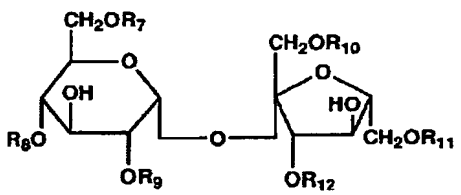
【請求項４】　蛋白可溶化剤が一般式（III）

【化３】

$$R_5(CH_2CH_2O)_a\text{-}H\cdot(C_2H_4COOR_6)_b \qquad (III)$$

〔式中、ａは１～２００の整数を表し、ｂは０または１を表し、R_5はR_{14}－Ｘ－Ｏ－（式中、R_{14}はアルキルまたはアルケニルを表し、Ｘは単結合またはＣＯを表す）または－（CH_2CH_2O）$_c$－Ｎ（R_{15}）－（式中、ｃは１～２００の整数を表し、R_{15}はアルキルまたはアルケニルを表す）を表し、R_6はアルキルまたはアルケニルを表す〕で表される化合物、一般式（IV）

【化４】



(IV)

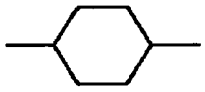
（式中、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}およびR_{12}は同一または異なってアルカノイルを表す）で表される化合物または一般式（Ｖ）

【化５】

$$R_{13}\text{-}Y\text{-}SO_3Na \qquad (V)$$

〔式中、R_{13}はアルキルまたはアルケニルを表し、Ｙは

【化６】



、－Ｏ－、－ＣＨ（R_{16}）－（式中、R_{16}はアルキルまたはアルケニルを表す）、－CH_2ＣＨ（ＯＨ）（CH_2）$_d$－（式中、ｄは１～２２の整数を表す）、－ＣＨ＝ＣＨ（CH_2）$_e$－（式中、ｅは１～２２の整数を表す）、－ＯＣＯＣＨ（CH_2ＣＯＯR_{17}）－（式中、R_{17}はアルキルまたはアルケニルを表す）またはこれらの混合物を表す〕で表される化合物である請求項１記載の定量法。

【請求項５】　蛋白可溶化剤が一般式（VI）

【化７】

$$R_{18}NHCH_2CH_2OH \qquad (VI)$$

（式中、R_{18}はアルキルまたはアルケニルを表す）で表される化合物、一般式（VII）

【化８】

$$R_{19}CON(CH_3)CH_2CH_2SO_3Na \qquad (VII)$$

（式中、R_{19}はアルキルまたはアルケニルを表す）で表される化合物または一般式（VIII）

【化９】

$$R_{20}O(CH_2CH_2O)_fH \qquad (VIII)$$

（式中、ｆは１～１００の整数を表し、R_{20}はアルキルまたはアルケニルを表す）で表される化合物である請求項２記載の定量法。

【請求項６】　蛋白可溶化剤が胆汁酸類である請求項２記載の定量法。

【請求項７】　試料中にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を作用させ生成する過酸化水素を定量することからなるコレステロール量を測定する方法において、使用するコレステロールエステル加水分解酵素またはコレステロール酸化酵素が化学修飾されたコレステロールエステラーゼまたは化学修飾されたコレステロールオキシダーゼである請求項１～請求項６記載の定量法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要な高密度リポ蛋白（ＨＤＬ）に含まれるコレステロール（以下、ＨＤＬコレステロールという）の定量法に関する。

【０００２】

【従来の技術】ＨＤＬは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るため細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとす

る各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知に有用な指針となることが知られている。従来のＨＤＬコレステロールの定量法は、大きく分けて分画操作とコレステロール定量操作の２段階からなる。分画操作法には、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法などがある。超遠心法を用いる場合には、分離用超遠心器で比重の差によってＨＤＬを分離し、そのコレステロール量を測定する。しかしながら、定量性、簡便性、経済性などの面で欠点がある。免疫化学的方法には、免疫電気泳動法、一元免疫拡散法（ＳＲＩＤ法）、オクタロニー法などがあるが、これらの方法を用いる場合にはアポ蛋白を認識しており、正確にはリポ蛋白を認識していないという問題がある。電気泳動法を用いる場合には、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として分離し、酵素法によりコレステロールを定量する。この方法は、簡便性、経済性などの面で問題がある。沈殿法を用いる場合には、低密度リポ蛋白（ＬＤＬ）、超低密度リポ蛋白（ＶＬＤＬ）およびカイロミクロン（ＣＭ）の表面に存在するアポ蛋白Ｂにポリエチレングリコール、ヘパリン、リンタングステン酸、デキストラン硫酸などのポリアニオンと２価の陽イオンを結合させ、不溶性沈殿物を形成させ、これを遠心分離操作によって除去し、上清中のＨＤＬコレステロールを定量する（臨床検査法提要、第２９版、金井泉著、金原出版、４７１頁、１９８３年）。この方法は最も簡便であるが、遠心分離器による遠心分離操作を行うため、多数検体処理、迅速測定および臨床検査の分野で多く使用されている自動分析装置には不向きである。さらに、従来の分画法では、分離したＨＤＬ画分を定量ピペットではかり取る場合などに人的誤差も生じ易い。以上のように、ＨＤＬコレステロール測定の煩雑さは、その分画操作にある。しかしながら、単純にＨＤＬを分画せずに血清検体を直接コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼが含有された試薬に添加しても、総コレステロールを定量する系と変わりがなく、ＨＤＬコレステロールを特異的に定量できない。特開昭６３－１２６４９８には、コール酸類を添加してその特異性を高めることが記載されているが、この方法では、ＨＤＬのみならずＬＤＬ、ＶＬＤＬなども徐々に反応し完全な反応終点が得られにくいことにより、特異性が必ずしも充分でない。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なＨＤＬコレステロールの定量法を提供することにある。

【０００４】

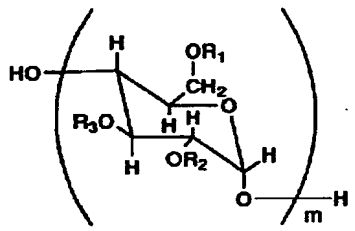
【課題を解決するための手段】本発明者らは、糖化合物および／または蛋白可溶化剤を存在させたコレステロール測定試薬の系により超遠心で分画されたＨＤＬ、ＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＣＭの各リポ蛋白を用いて測定したところ、糖化合物および／または蛋白可溶化剤の組み合わせにより各リポ蛋白との反応性が異なり、その結果ＨＤＬコレステロール、ＬＤＬコレステロール、ＶＬＤＬコレステロール、ＣＭコレステロールの反応性が異なることを見い出し、本発明に至った。

【０００５】本発明は、糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中のＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＣＭ中のコレステロール量を測定し、試料中の総コレステロール量との差を求めることを特徴とするＨＤＬコレステロールの定量法に関する。また、本発明により、糖化合物および／または蛋白可溶化剤存在下、試料中のＨＤＬ中のコレステロール量を測定することを特徴とするＨＤＬコレステロールの定量法を提供することができる。

【０００６】糖化合物としては、一般式（Ｉ）

【０００７】

【化１０】



(I)

【０００８】〔式中、R_1、R_2およびR_3は同一または異なって水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルカノイル、スルホ、－（グルコシル）$_p$－Ｈ（式中、ｐは１または２を表す）または－（マルトシル）$_q$－Ｈ（式中、ｑは１または２を表す）を表し、ｍは６～８の整数を表す〕で表される化合物または一般式（II）

【０００９】

【化１１】

$$(C_6H_{10}O_5)_nSO_3R_4 \qquad (II)$$

【００１０】（式中、R_4は水素またはＮａを表し、ｎは５～２０００の整数を表す）で表される化合物が好ましく用いられる。また、試料中のＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＣＭ中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、一般式（III）

【００１１】

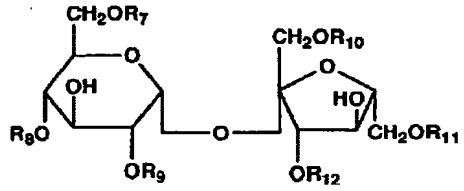
【化１２】

$$R_5(CH_2CH_2O)_aH\cdot(C_2H_4COOR_6)_b \qquad (III)$$

【００１２】〔式中、ａは１～２００の整数を表し、ｂは０または１を表し、R_5はR_{14}－Ｘ－Ｏ－（式中、R_{14}はアルキルまたはアルケニルを表し、Ｘは単結合またはＣＯを表す）または$H-(CH_2CH_2O)_c-N(R_{15})-$（式中、ｃは１～２００の整数を表し、$R_{15}$はアルキルまたはアルケニルを表す）を表し、$R_6$はアルキルまたはアルケニルを表す〕で表される化合物、一般式（IV）

【００１３】

【化１３】



(IV)

【００１４】（式中、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}およびR_{12}は同一または異なってアルカノイルを表す）で表される化合物または一般式（Ｖ）

【００１５】

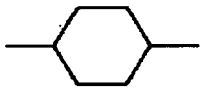
【化１４】

$$R_{13}\text{–}Y\text{–}SO_3Na \qquad (V)$$

【００１６】〔式中、R_{13}はアルキルまたはアルケニルを表し、Ｙは

【００１７】

【化１５】



、

【００１８】－Ｏ－、－ＣＨ（R_{16}）－（式中、R_{16}はアルキルまたはアルケニルを表す）、－CH_2ＣＨ（ＯＨ）（CH_2）$_d$－（式中、ｄは１～２２の整数を表す）、－ＣＨ＝ＣＨ（CH_2）$_e$－（式中、ｅは１～２２の整数を表す）、－ＯＣＯＣＨ（CH_2 ＣＯＯR_{17}）－（式中、R_{17}はアルキルまたはアルケニルを表す）またはこれらの混合物を表す〕で表される化合物が、試料中のＨＤＬ中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、一般式（VI）

【００１９】

【化１６】

$$R_{18}NHCH_2CH_2OH \qquad (VI)$$

【００２０】（式中、R_{18}はアルキルまたはアルケニルを表す）で表される化合物、一般式（VII）

【００２１】

【化１７】

$$R_{19}CON(CH_3)CH_2CH_2SO_3Na \qquad (VII)$$

【００２２】（式中、R_{19}はアルキルまたはアルケニルを表す）で表される化合物、一般式（VIII）

【００２３】

【化１８】

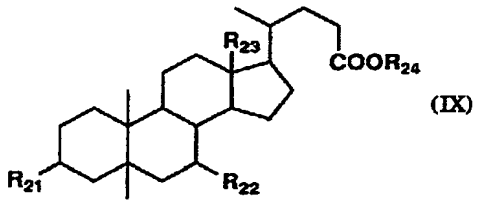
$$R_{20}O(CH_2CH_2O)_fH \qquad (VIII)$$

【００２４】（式中、ｆは１～１００の整数を表し、R_{20}はアルキルを表す）で表される化合物または胆汁酸類が好ましく用いられる。以下、一般式（Ｉ）～一般式（VIII）で表される化合物をそれぞれ化合物（Ｉ）～化合物（VIII）という。一般式（Ｉ）～一般式（VIII）の各基の定義において、アルキルおよびアルカノイルのアルキル部分としては、直鎖または分枝状の炭素数１～２２の、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert- ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、デシル、ペンタデシル、イコサニル、ドコサニルなどがあげられ、アルケニルとしては、炭素数２～２２の、例えば、ビニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、デセニル、ペンタデセニル、イコセニル、ドコセニルなどがあげられる。

【００２５】置換アルキルおよび置換アルカノイルの置換基としては、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、スルホなどがあげられる。胆汁酸類としては、例えば一般式（IX）

【００２６】

【化１９】



(IX)

【００２７】〔式中、R_{21}およびR_{22}は同一または異なって水素、－OR_{25}（式中、R_{25}は水素、スルホまたはＳＯ$_3$Ｎａを表す）またはオキソを表し、R_{23}は水素または－OR_{25}（式中、R_{25}は前記と同義である）を表し、R_{24}は水素、アルキル、アルケニルまたは金属を表す〕で表される化合物があげられる。金属としては、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属などがあげられ、アルキルおよびアルケニルは前記と同義である。

【００２８】糖化合物としては、化合物（Ｉ）または化合物（II）の中でもシクロデキストリン誘導体が、特にメチル化シクロデキストリンなどが好ましく用いられる。例えば、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン、γ－シクロデキストリン、ジメチル－β－シクロデキストリン、トリメチル－β－シクロデキストリン、ヒドロキシエチル－β－シクロデキストリン、２－ヒドロキシプロピル－α－シクロデキストリン、２－ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン、カルボキシメチル－β－シクロデキストリン、グリコシル－β－シクロデキストリン、マルトシル－α－シクロデキストリン、マルトシル－β－シクロデキストリン、パーシャリーメチル－β－シクロデキストリン、α－シクロデキストリンスルフェート、β－シクロデキストリンスルフェートなどがあげられる。

【００２９】試料中のＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＣＭ中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、化合物（III）、化合物（IV）または化合物（Ｖ）などの界面活性剤の中でも、特にノニオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤などが好ましく用いられる。ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエ

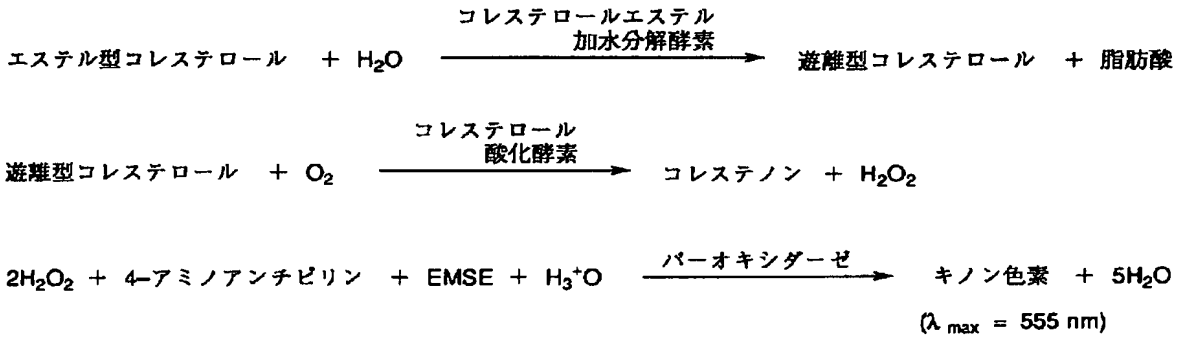
ーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンベヘニルエーテル、ポリオキシエチレンモノラウレート、ポリオキシエチレンモノステアレート、ポリオキシエチレンモノオレエート、ポリオキシエチレンラウリルアミン、ポリオキシエチレンステアリルアミン、しょ糖脂肪酸エステルなどがあげられ、アニオン系界面活性剤としては、例えば、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ノルマルドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、高級アルコール硫酸エステルソーダなどがあげられる。

【００３０】試料中のＨＤＬ中のコレステロール量を測定する際の蛋白可溶化剤としては、化合物（VI）、化合物（VII）、化合物（VIII）または胆汁酸類などの界面活性剤の中でも、特にカチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、ノニオン系界面活性剤、胆汁酸塩などが好ましく用いられる。カチオン系界面活性剤としては、例えば、オキシエチレンドデシルアミン、ポリオキシエチレンドデシルアミン、ポリオキシエチレンオクタデシルアミンなどがあげられ、アニオン系界面活性剤としては、例えば、ココイルメチルタウリン酸ナトリウム、ラウロイルメチルタウリン酸ナトリウム、ミリストイルメチルタウリン酸ナトリウム、パルミトイルメチルタウリン酸ナトリウム、ステアロイルメチルタウリン酸ナトリウムなどがあげられ、ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンベヘニルエーテルなどがあげられ、胆汁酸塩としては、例えば、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、ウルソデオキシコール酸ナトリウム、リトコール酸ナトリウム、イソケノデオキシコール酸ナトリウム、７－オキソリトコール酸ナトリウム、１２－オキソリトコール酸ナトリウム、１２－オキソケノデオキシコール酸ナトリウム、７－オキソデオキシコール酸ナトリウムなどがあげられる。

【００３１】本発明は、糖化合物および／または蛋白可溶化剤をコレステロール測定試薬系と共存させる点に特徴を有するものであり、コレステロール測定系自体は下記の反応原理に基づく一般法に従うものである。ただし、色原体および測定波長はこれに限定されるものではない。

【００３２】

【数１】



EMSE：N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン

【００３３】コレステロールエステル加水分解酵素あるいはコレステロール酸化酵素としては、通常市販されている、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼやリポプロテインリパーゼ、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼなどがあげられるが、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロピル基などで上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

【００３４】本発明方法は、血液、尿などのＨＤＬを含有する体液に適用できる。次に、本発明の定量法について説明する。本発明を実施するに際しては、まず、糖化合物溶液および／または蛋白可溶化剤溶液を調製する。糖化合物溶液は、糖化合物を適当な緩衝液、例えば５０ｍＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．４）に溶解し、反応時に例えば１００ｍＭ以下、好ましくは３～８０ｍＭの濃度になるように調製する。なお、糖化合物はあらかじめコレステロール測定試薬中に共存させておいてもよい。蛋白可溶化剤溶液は、コレステロール測定試薬と共存させ、反応時に例えば５０ｇ／ｌ以下、好ましくは０．１～２０ｇ／ｌの濃度になるように調製する。試薬は、糖化合物溶液および／またはコレステロール測定試薬が共存した蛋白可溶化剤溶液から調製し、２０～５０

℃、好ましくは３０～４０℃で約５分保温する。次いで、上記試薬に試料そのものもしくは必要に応じて水あるいは生理食塩水で希釈した試料を加え、５～３０分間反応させる。反応終了後、反応液の吸光度を５００～６００ｎｍ、例えば５５５ｎｍで測定し、コレステロール量を算出する。試料中のＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＣＭ中のコレステロール量を測定した場合には、別に総コレステロール量を求め、これらの差を求めることによりＨＤＬコレステロールが定量できる。

【００３５】血清から超遠心により分画されたＨＤＬ、ＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＣＭの各フラクションを使用して上記試薬によりコレステロール量を測定した。その結＊果、糖化合物および蛋白可溶化剤の組み合わせによりＨＤＬコレステロール、ＬＤＬコレステロール、ＶＬＤＬコレステロール、ＣＭコレステロールの反応性が異なり、糖化合物および蛋白可溶化剤の組み合わせにより各リポ蛋白との反応性が異なることが確認された。

【００３６】コレステロール測定試薬に糖化合物５ｍＭおよび蛋白可溶化剤ポリオキシエチレンラウリルエーテル５ｇ／ｌを組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の反応性の差を第１表に示す。

【００３７】

【表１】

第　１　表

糖化合物	HDL	LDL	VLDL	CM
α－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
β－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
γ－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
ジメチル－β－シクロデキストリン	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
トリメチル－β－シクロデキストリン	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ヒドロキシエチル－β－シクロデキストリン	－	＋＋	＋＋	＋＋
2－ヒドロキシプロピル－α－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
2－ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン	－	＋＋	＋＋	＋＋
カルボキシメチル－β－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
グルコシル－β－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
マルトシル－α－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
マルトシル－β－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
パーシャリーメチル－β－シクロデキストリン	＋	＋＋	＋＋	＋＋
α－シクロデキストリンスルフェート	＋	＋＋	＋＋	＋＋
β－シクロデキストリンスルフェート	＋	＋＋	＋＋	＋＋

－，＋，＋＋，＋＋＋はそれぞれ反応の強さを示し，－＜＋＜＋＋＜＋＋＋である

【００３８】コレステロール測定試薬に糖化合物ジメチル－β－シクロデキストリン５ｍＭおよび蛋白可溶化剤５ｇ／ｌを組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の※反応性の差を第２表に示す。

【００３９】

【表２】

第　２　表

蛋白可溶化剤	HDL	LDL	VLDL	CM
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンセチルエーテル	＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンステアリルエーテル	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンオレイルエーテル	＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンベヘニルエーテル	＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンモノラウレート	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンモノステアレート	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンモノオレエート	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンラウリルアミン	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
ポリオキシエチレンステアリルアミン	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
しょ糖脂肪酸エステル	＋	＋＋	＋＋	＋＋
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	＋	＋＋	＋＋	＋＋
ノルマルドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	＋	＋＋	＋＋	＋＋
ラウリル硫酸ナトリウム	＋	＋＋	＋＋	＋＋
高級アルコール硫酸エステルソーダ	－	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋

－，＋，＋＋，＋＋＋はそれぞれ反応の強さを示し，－＜＋＜＋＋＜＋＋＋である

【００４０】コレステロール測定試薬に糖化合物５ｍＭおよび蛋白可溶化剤オキシエチレンドデシルアミン５ｇ

／１を組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の反応性の差を第３表に示す。

【００４１】

【表３】

第　３　表

糖化合物	HDL	LDL	VLDL	CM
α−シクロデキストリン	++	+	+	+
β−シクロデキストリン	++	+	+	+
γ−シクロデキストリン	++	+	+	+
ジメチル−β−シクロデキストリン	+++	+	+	+
トリメチル−β−シクロデキストリン	+++	+	+	+
ヒドロキシエチル−β−シクロデキストリン	++	+	+	+
2−ヒドロキシプロピル−α−シクロデキストリン	++	+	+	+
2−ヒドロキシプロピル−β−シクロデキストリン	++	+	+	+
カルボキシメチル−β−シクロデキストリン	++	+	+	+
グルコシル−β−シクロデキストリン	++	+	+	+
マルトシル−α−シクロデキストリン	++	+	+	+
マルトシル−β−シクロデキストリン	++	+	+	+
パーシャリーメチル−β−シクロデキストリン	++	+	+	+
α−シクロデキストリンスルフェート	++	+	+	+
β−シクロデキストリンスルフェート	++	+	+	+

+, ++, +++はそれぞれ反応の強さを示し, + < ++ < +++である

【００４２】コレステロール測定試薬に糖化合物ジメチルーβーシクロデキストリン５mMおよび蛋白可溶化剤５ｇ／１を組み合わせて共存させたときの各リポ蛋白の※反応性の差を第４表に示す。

【００４３】

【表４】

第　４　表

蛋白可溶化剤	HDL	LDL	VLDL	CM
オキシエチレンドデシルアミン	+++	+−	+−	+−
ポリオキシエチレンドデシルアミン	++	+	+	+
ポリオキシエチレンオクタデシルアミン	++	+	+	+
ココイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ラウロイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ミリストイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
パルミトイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ステアロイルメチルタウリン酸ナトリウム	++	+	+	+
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンセチルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンステアリルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンオレイルエーテル	++	+	+	+
ポリオキシエチレンベヘニルエーテル	++	+	+	+
コール酸ナトリウム	+++	+	+	+
デオキシコール酸ナトリウム	+++	+	+	+

+−, +, ++, +++はそれぞれ反応の強さを示し, +− < + < ++ < +++である

【００４４】第１表～第４表に示されるように、第１表または第２表の組み合わせの場合はＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＣＭ中のコレステロール量から間接的にＨＤＬ中のコレステロール量を測定することができ、第３表または第４表の組み合わせの場合は直接的にＨＤＬ中のコレステロール量を測定することができる。次に、実施例によって本発明の態様を説明する。

【００４５】

【実施例】

実施例１

ジメチルーβーシクロデキストリン（５mM）、ポリオキシエチレンラウリルアミン（５ｇ／ｌ）、コレステロールエステラーゼ（１．０U／ｍｌ）、コレステロールオキシダーゼ（５．０U／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２mM）、ＥＭＳＥ（１．１mM）および３０mMグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬を調製した。試料としては、血清から超遠心で分画されたＬＤＬ、ＶＬＤＬ、ＣＭの混合サンプルを用いた。あらかじめ３７℃で加温した上記試薬３ｍｌにサンプル５０μｌを混和し、３７℃で１５分間反応させ、得られた溶液の５５５ｎｍにおける吸光度を測定した。

【００４６】その結果を第１図に示す。第１図は、ＬＤ

Ｌ＋ＶＬＤＬ＋ＣＭコレステロール濃度と吸光度との相関関係を示すもので、ＬＤＬ＋ＶＬＤＬ＋ＣＭコレステロール濃度は吸光度とよい相関を示した。

【００４７】実施例２

血清から超遠心で分画されたＬＤＬ、ＶＬＤＬ、ＣＭの混合サンプルの代わりに血清サンプルを用いる以外は実施例１と同様の操作を行って吸光度を測定し、第１図を基準に血清サンプル中のＬＤＬ＋ＶＬＤＬ＋ＣＭコレステロール濃度（Ａ）を求めた。別に、血清サンプル中の総コレステロール濃度（Ｂ）を、酵素法のコレステロール測定試薬で測定し、求めた。ＨＤＬコレステロール濃度は［（Ｂ）－（Ａ）］とした。対照法として、デキストラン硫酸－リンタングステン酸－Ｍｇ沈殿法〔デタミナーＨＤＬ（協和メデックス社製）で沈殿〕（臨床化学、初版、荻三男著、医典社、１１０頁、１９８７年）を用いて、血清サンプル中のＨＤＬコレステロール濃度を求めた。

【００４８】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数ｒ＝０．８３２０（ｎ＝２０）〕。

【００４９】実施例３

ジメチル－β－シクロデキストリン（５ｍＭ）、ポリオキシエチレンラウリルアミン（５ｇ／ｌ）、コレステロールエステラーゼ（１．０Ｕ／ｍｌ）、コレステロールオキシダーゼ（５．０Ｕ／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２ｍＭ）、ＥＭＳＥ（１．１ｍＭ）および３０ｍＭグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬の代わりにヒドロキシエチル－β－シクロデキストリン（１０ｍＭ）、ポリオキシエチレンモノラウレート（０．５ｇ／ｌ）、コレステロールエステラーゼ（１．０Ｕ／ｍｌ）、コレステロールオキシダーゼ（５．０Ｕ／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２ｍＭ）、ＥＭＳＥ（１．１ｍＭ）、３０ｍＭグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬を用いる以外は実施例２と同様の操作を行い、沈殿法による結果と比較した。

【００５０】その結果を第５表に示す。

【００５１】

【表５】

第　５　表

サンプル	HDLコレステロール濃度（mg/dl）	
	本発明の方法	沈殿法
1	49	42
2	75	68
3	83	75
4	53	58
5	94	96

【００５２】第５表に示すように、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した。

【００５３】実施例４

ジメチル－β－シクロデキストリン（５ｍＭ）、ポリオキシエチレンラウリルアミン（５ｇ／ｌ）、コレステロールエステラーゼ（１．０Ｕ／ｍｌ）、コレステロールオキシダーゼ（５．０Ｕ／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２ｍＭ）、ＥＭＳＥ（１．１ｍＭ）および３０ｍＭグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬の代わりにジメチル－β－シクロデキストリン（５ｍＭ）、コレステロールエステラーゼ（１．０Ｕ／ｍｌ）、コレステロールオキシダーゼ（５．０Ｕ／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２ｍＭ）、ＥＭＳＥ（１．１ｍＭ）および３０ｍＭグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬を用いる以外は実施例２と同様の操作を行い、沈殿法による結果と比較した。

【００５４】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数ｒ＝０．９６９（ｎ＝２０）〕。

【００５５】実施例５

ジメチル－β－シクロデキストリン（５ｍＭ）、オキシエチレンドデシルアミン（０．２５ｇ／ｌ）、コレステロールエステラーゼ（１．０Ｕ／ｍｌ）、コレステロールオキシダーゼ（５．０Ｕ／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２ｍＭ）、ＥＭＳＥ（１．１ｍＭ）、３０ｍＭグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬を調製した。試料としては、血清から超遠心で分画されたＨＤＬのサンプルを用いた。あらかじめ３７℃で加温した上記試薬３ｍｌにサンプル５０μｌを混和し、３７℃で１５分間反応させ、得られた溶液の５５５ｎｍにおける吸光度を測定した。

【００５６】その結果を第２図に示す。第２図は、ＨＤＬコレステロール濃度と吸光度との相関関係を示すもので、ＨＤＬコレステロール濃度は吸光度とよい相関を示した。

【００５７】実施例６

血清から超遠心で分画されたＨＤＬのサンプルの代わりに血清サンプルを用いる以外は実施例５と同様の操作を行って吸光度を測定し、第２図を基準に血清サンプル中のＨＤＬコレステロール濃度を求めた。対照法として、デキストラン硫酸－リンタングステン酸－Ｍｇ沈殿法〔デタミナーＨＤＬ（協和メデックス社製）で沈殿〕（臨床化学、初版、荻三男著、医典社、１１０頁、１９８７年）を用いて、血清サンプル中のＨＤＬコレステロール濃度を求めた。

【００５８】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数ｒ＝０．８８９（ｎ＝２０）〕。

【００５９】実施例７

ジメチル－β－シクロデキストリン（５ｍＭ）、オキシエチレンドデシルアミン（０．２５ｇ／ｌ）、コレステロールエステラーゼ（１．０Ｕ／ｍｌ）、コレステロールオキシダーゼ（５．０Ｕ／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２ｍＭ）、ＥＭＳＥ（１．１ｍＭ）、３０

mMグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬の代わりにコール酸ナトリウム（５ｍｇ／ｍｌ）、ポリエチレングリコールで修飾したコレステロールエステラーゼ（１．０Ｕ／ｍｌ）、ポリエチレングリコールで修飾したコレステロールオキシダーゼ（５．０Ｕ／ｍｌ）、４－アミノアンチピリン（２．２mM）、ＥＭＳＥ（１．１mM）、３０mMグッド緩衝液（ｐＨ６．７５）からなる試薬を用いる以外は実施例６と同様の操作を行い、沈殿法による結果と比較した。

【００６０】その結果、本発明の方法による結果は沈殿法による結果と良好な相関を示した〔相関係数ｒ＝０．＊９８０（ｎ＝４０）〕。

【００６１】

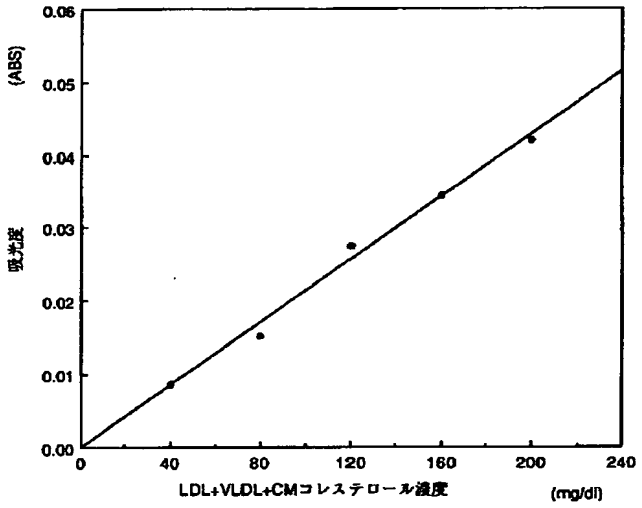
【発明の効果】本発明により、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なＨＤＬコレステロールの定量法が提供される。

【図面の簡単な説明】

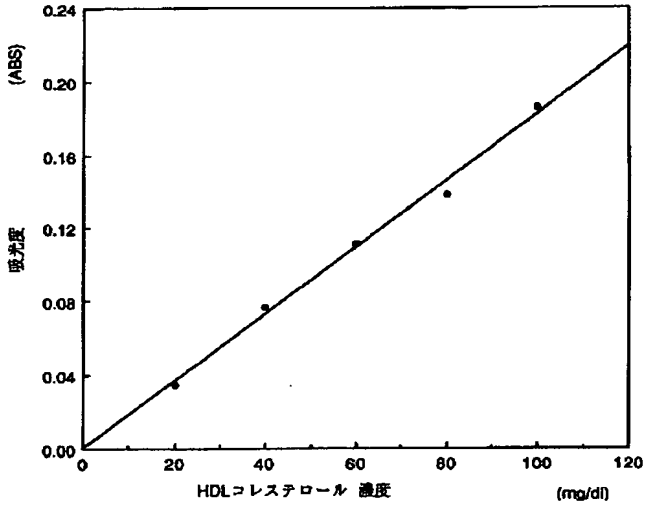
【図１】ＬＤＬ＋ＶＬＤＬ＋ＣＭコレステロール濃度と本発明の方法により測定された吸光度との相関関係を示すものである。

【図２】ＨＤＬコレステロール濃度と本発明の方法により測定された吸光度との相関関係を示すものである。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	Ｆ Ｉ	技術表示箇所
Ｇ０１Ｎ　21/31		Ｚ		
21/77		Ｂ		

(72)発明者　杉内　博幸
熊本県熊本市長嶺町1675－31
(72)発明者　入江　徹美
熊本県熊本市健軍町2484－17
※(72)発明者　上釜　兼人
熊本県熊本市長嶺町1716－80
(72)発明者　大澤　進
千葉県四街道市みそら４－17－９